丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中有氧氧化特性分析

姚金美[1,2], 王启龙[1], 赵林川[1,*]

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123; 2. 苏州科铭生物技术有限公司, 江苏苏州 215123)

摘要:【目的】有氧氧化中葡萄糖(Glc)、丙酮酸(PA)、乙酰 CoA(AC)、还原型吡啶核苷酸(NADH)和腺苷三磷酸(ATP)摩尔数的理论比值为 1∶2∶2∶10∶30~32,而已糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶 1(PFK1)、丙酮酸激酶(PK)、丙酮酸脱氢酶(PDH)、柠檬酸合酶(CS)、异柠檬酸脱氢酶(ICDHm)、α-酮戊二酸脱氢酶(α-KGDH)、NADH 泛醌还原酶(NCR)、琥珀酸泛醌还原酶(SCR)、泛醌细胞色素 C 还原酶(CCR)、细胞色素 C 氧化酶(CCO)和 ATP 合酶(AS)活性的理论比值为 1∶1∶2∶2∶2∶2∶2∶10∶2∶12∶12∶26~28。本研究旨在分析丝蛋白合成和分泌期家蚕 *Bombyx mori* 丝腺有氧氧化的特性。【方法】利用分光光度法和高效液相色谱法测定了上述生化指标的变化。【结果】丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中检测不到 Glc,产物含量以 1/30 ATP, 1/10 NADH, 1/2 AC 和 1/2 PA 的顺序递增;糖酵解途径相关酶活性,以 PFK1 活性最低;三羧酸循环相关酶活性以 1/2 ICDHm, 1/2 α-KGDH 和 1/2 CS 的顺序递增;氧化磷酸化相关酶包括 1/26 AS, 1/10 NCR, 1/2 SCR, 1/12 CCR 和 1/12 CCO 的活性以 1/26 AS 活性最低;1/26 AS, 1/2 ICDHm, 1/2 PDH 和 PFK1 的活性依次递增。NADH 含量、ATP 含量、PFK1 活性、PDH 活性 和 NCR 活性在丝蛋白合成期升高,但在丝蛋白分泌期下降。【结论】据此推测,家蚕丝腺中 PFK1,ICDHm 和 AS 分别是糖酵解途径、三羧酸循环和氧化磷酸化的限速酶;糖酵解途径、丙酮酸脱氢、三羧酸循环和氧化磷酸化速率依次递减;有氧氧化速率在丝蛋白合成期升高,相反在丝蛋白分泌期降低。

关键词: 家蚕; 丝腺; 丝蛋白; 有氧氧化; 限速酶

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)01-0001-07

Characterization of aerobic oxidation in the silkgland of the silkworm (*Bombyx mori*) during the synthesis and secretion of silk proteins

YAO Jin-Mei[1,2], WANG Qi-Long[1], ZHAO Lin-Chuan[1,*] (1. School of Biology and Basic Medicine Science, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. Comin Biotechnology Co. Ltd., Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract:【Aim】The theoretical mole ratio of glucose (Glc) to pyruvate acid (PA), acetyl-CoA (AC), reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and adenosine nucleoside triphosphate (ATP) is 1∶2∶2∶10∶30-32, while the theoretical activity ratio of hexokinase (HK) to phosphofructokinase 1 (PFK1), pyruvate kinase (PK), pyruvate dehydrogenase (PDH), citrate synthase (CS), mitochondria isocitrate dehydrogenase (ICDHm), α-ketoglutarate dehydrogenase (α-KGDH), NADH CoQ reductase (NCR), succinate CoQ reductase (SCR), CoQ cytochrome C reductase (CCR), cytochrome C oxidase (CCO) and ATP synthase (AS) is 1∶1∶2∶2∶2∶2∶2∶10∶2∶12∶12∶26-28 in aerobic oxidation. This study aims to characterize aerobic oxidation in the silkgland of the silkworm,

基金项目: 家蚕基因组生物学国家重点实验室开放课题(20120009); 国家自然科学基金项目(31472150)

作者简介: 姚金美, 女, 1986 年 8 月生, 江西上饶人, 硕士研究生, 主要从事家蚕生理生化研究, E-mail: yaojm3948@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sdzlc2008@126.com

收稿日期 Received: 2015-05-31; 接受日期 Accepted: 2015-12-16

Bombyx mori, during the synthesis and secretion of silk proteins.【Methods】The contents of Glc, PA, AC, NADH and ATP, and the enzymatic activities of PFK1, PK, PDH, CS, ICDHm, α-KGDH, NCR, SCR, CCR, CCO and AS were determined using spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods.【Results】In the silkgland of *B. mori*, Glc was undetectable, and the molar concentration increased in the order of 1/30 ATP, 1/10 NADH, 1/2 AC and 1/2 PA during the synthesis and secretion of silk proteins. Among the related enzymes of glycolysis, the PFK1 activity was the lowest; the activities of the related enzymes of tricarboxylic acid cycle increased in the order of 1/2 ICDHm, 1/2 α-KGDH and 1/2 CS; the activities of the related enzymes of oxidative phosphorylation increased in the order of 1/26 AS, 1/10 NCR, 1/2 SCR, 1/12 CCR and 1/12 CCO, with the 1/26 AS activity the lowest. During the synthesis and secretion of silk proteins, the activities of 1/26 AS, 1/2 ICDHm, 1/2 PDH and PFK1 increased sequentially. The concentrations of NADH and ATP and the activities of PFK1, PDH and NCR generally increased during the synthesis of silk proteins but decreased during the secretion of silk proteins.【Conclusion】It is so inferred that PFK1, ICDHm and AS are the rate-limiting enzymes of glycolysis, tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation, respectively, the rates of glycolysis, pyruvate dehydrogenation, tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation decrease progressively in the silkgland during the synthesis and secretion of silk proteins, and the rates of aerobic oxidation increase during the synthesis but decrease during the secretion of silk proteins.

Key words: *Bombyx mori*; silkgland; silk protein; aerobic oxidation; rate-limiting enzyme

家蚕 *Bombyx mori* 丝腺(silkgland)分别在 5 龄期和吐丝期合成和分泌丝蛋白(silk protein)(向仲怀, 2005)。蛋白质合成中每增加 1 个肽键平均需要消耗 5 个高能磷酸键的能量(查锡良, 2008)。三磷酸腺苷(adenosine nucleotide triphosphate, ATP)是生物能量通货。对于好氧生物而言,主要通过有氧氧化(aerobic oxidation)合成 ATP(查锡良, 2008)。关于家蚕丝蛋白合成及其调控机制已经有很多研究(向仲怀, 2005; Li *et al*, 2011)。但是关于家蚕丝腺有氧氧化特性的研究尚未见报道。

限速酶活性、底物供应量和产物堆积量以及能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值在有氧氧化中起到重要调控作用(查锡良, 2008)。有氧氧化由糖酵解途径、丙酮酸脱氢、三羧酸循环和氧化磷酸化依次衔接的 4 个阶段组成。1 mol 葡萄糖(glucose, Glc)通过糖酵解途径生成 2 mol 丙酮酸(pyruvate acid, PA)、2 mol 还原型吡啶核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)和 2 mol ATP,已糖激酶(hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶 1(phosphofructokinase 1, PFK1)和丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是糖酵解途径的 3 个调控关键酶。2 mol PA 进一步脱氢生成 2 mol 乙酰 CoA(acetyl CoA, AC)、2 mol CO_2 和 2 mol NADH,丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)复合体催化 PA 脱氢脱羧。2 mol AC 通过三羧酸循环生成 6 mol NADH、2 mol 还原型黄素腺嘌呤二核苷酸(reduced flavin adenine dinucleotide, $FADH_2$)、2 mol ATP 和 4 mol CO_2,柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)、线粒体异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, ICDHm)和 α-酮戊二酸脱氢酶(α-ketoglutarate dehydrogenase, α-KGDH)是三羧酸循环的 3 种调控关键酶。以上 3 个阶段生成的 10 mol NADH 和 2 mol $FADH_2$ 通过氧化磷酸化生成 26 ~ 28 mol ATP 和 6 mol H_2O,实际生成 ATP 的摩尔数取决于糖酵解途径生成的 2 mol NADH 穿梭进入线粒体的不同机制。NADH-泛醌还原酶(NADH CoQ reductase, NCR)、琥珀酸-泛醌还原酶(succinate CoQ reductase, SCR)、泛醌-细胞色素 C 还原酶(CoQ cytochrome C reductase, CCR)、细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, CCO)和 ATP 合酶(ATP synthase, AS)是氧化磷酸化的 5 种酶复合体,其中 NCR 催化 10 mol NADH 脱氢生成 10 mol 氧化型吡啶核苷酸(oxidized nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)和 10 mol 还原型 CoQ,SCR 催化 2 mol $FADH_2$ 脱氢生成氧化型黄素腺嘌呤二核苷酸(oxidized flavin adenine dinucleotide, FAD)和 2 mol还原型 CoQ,CCR 催化 12 mol 还原型 CoQ 生成 12 mol 氧化型 CoQ 和 12 mol 还原型细胞色素 C,CCO 催化 12 mol 还原型细胞色素 C 生成 12 mol 氧化型细胞色素 C,伴随上述过程形成的质子电动力

势推动 AS 催化合成 26 ~ 28 mol ATP。可见，1 mol Glc 通过有氧氧化最终生成 30 ~ 32 mol ATP。因此，以摩尔含量来计算，有氧氧化中 Glc，PA，AC，NADH 和 ATP 含量的理论比值为 1∶2∶2∶10∶30 ~ 32；相应地，以单位时间内催化生成的产物摩尔数量来计算，HK，PFK1，PK，PDH，CS，ICDHm，α-KGDH，NCR，SCR，CCR，CCO 和 AS 活性的理论比值为 1∶1∶2∶2∶2∶2∶2∶10∶2∶12∶12∶26 ~ 28。

本实验系统测定其 Glc，PA，AC，NADH，NAD^+，ADP，AMP 和 ATP 含量，HK，PFK，PK，PDH，CS，ICDHm，α-KGDH，NCR，SCR，CCR，CCO 和 AS 活性，计算了 NADH/NAD^+ 比值和能荷。为了便于比较上述产物含量和酶活性，按照其理论比值调整了实际测定值，即比较 Glc，1/2 PA，1/2 AC，1/10 NADH 和 1/30 ATP 含量的大小以及 HK，PFK1，1/2 PK，1/2 PDH，1/2 CS，1/2 ICDHm，1/2 α-KGDH，1/10 NCR，1/2 SCR，1/12 CCR，1/12 CCO 和 1/26 AS 活性的高低。通过分析丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中有氧氧化特性，解明家蚕丝腺高效率合成与分泌丝蛋白的能量供应机制。

1　材料与方法

1.1　供试家蚕品种、取样和试剂盒

供试家蚕品种为皓月（Haoyue），由苏州大学蚕桑研究所提供。选择发育和体重一致的 5 龄雄性起蚕，置光照培养箱中，26 ± 1℃、光周期 12L∶12D 桑叶育，在 5 龄第 7 天见熟。分别在 5 龄第 2 天、5 龄第 5 天、5 龄第 7 天，吐丝 12 h、吐丝 24 h 和吐丝 36 h 取样，在冰浴中解剖取丝腺，分别代表丝蛋白合成的早期、中期和后期，以及丝蛋白分泌的早期、中期和后期。鉴于不同取样时期丝腺大小存在显著差异，为了保证测定需要，在丝蛋白合成早期、丝蛋白分泌中期和丝蛋白分泌晚期分别解剖 40 头雄蚕，在丝蛋白合成中期、丝蛋白合成晚期和丝蛋白分泌早期分别解剖 20 头雄蚕。每个时期解剖获得的所有丝腺，在液氮速冻后迅速磨碎混匀，分成 60 等份，置于 −80℃ 冰箱中保存，用于酶活性和代谢产物含量测定。

Glc 含量、HK 活性、PFK 活性、PK 活性、PA 含量、PDH 活性、AC 含量、CS 活性、ICDHm 活性、α-KGDH 活性、NADH 含量、NCR 活性、NAD^+ 含量、SCR 活性、CCR 活性、CCO 活性、ADP 含量、AMP 含量、AS 活性和 ATP 含量测定用试剂盒由苏州科铭生物技术有限公司提供。

1.2　生化指标测定

糖酵解途径中 Glc 含量、HK 活性、PFK 活性、PK 活性和 PA 含量测定方法分别基于 Glc 氧化酶（Glc oxidase，GOD）法，PK-乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）联合催化 NADH 氧化法，LDH 催化 NADH 氧化法，2，4-二硝基苯肼（dinitrobenzene hydrazine，DNPH）法和 2，6-二氯吲哚酚（2，6-dichloroindolephenol，DCIP）还原法。丙酮酸脱氢中 PDH 活性和 AC 含量测定方法分别基于氧化型噻唑蓝（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）还原法和苹果酸脱氢酶-CS 联合催化 NAD^+ 还原法。三羧酸循环中 CS 活性、ICDHm 活性、α-KGDH 活性和 NADH 含量测定方法分别基于乙醇脱氢酶-MTT 还原法、柠檬酸裂解酶-DNPH 法、NAD^+ 还原法和 NAD^+ 还原法。氧化磷酸化中 NCR 活性、NAD^+ 含量、SCR 活性、CCR 活性、CCO 活性、ADP 含量、AMP 含量、AS 活性和 ATP 含量测定方法分别基于 NAD^+ 还原法、NAD^+ 还原法、NADH 氧化法、氧化型细胞色素 C 还原法、还原型细胞色素 C 氧化法、高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）、HPLC、钼酸铵-硫酸亚铁还原法和 HPLC 法。

按照上述试剂盒的说明书进行提取、测定和计算，Glc，PA，AC，NADH，NAD^+，ADP，AMP 和 ATP 含量单位为 nmol/pair silkgland，HK，PFK1，PK，PDH，CS，ICDHm，α-KGDH，NCR，SCR，CCR，CCO 和 AS 活性单位为 nmol/pair silkgland · min。

1.3　数据统计分析

每个时期的每个指标分别取 3 支 Eppendorf 管中样品进行 3 次平行测定。采用 SPSS 软件比较样品间的差异显著性。

2　结果

2.1　丝蛋白合成和分泌期丝腺中糖酵解途径相关指标的变化

表 1 显示了丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中糖酵解途径相关指标的变化。在丝腺中未能检测到 Glc，HK 和 PFK1 活性在丝蛋白合成期呈升高趋势，相反在丝蛋白分泌期呈下降趋势，PK 活性分别在丝蛋白合成中期和丝蛋白分泌中期出现峰值，PA 含量在丝蛋白合成期和分泌期都呈现升高趋势，相关酶活性中以 PFK1 最低。

表 1 丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中糖酵解途径相关指标的变化

Table 1 Changes in the related indexes of glycolysis in the silkgland of *Bombyx mori* during the synthesis and secretion of silk proteins

取样时期 Sampling stage	葡萄糖含量 Glc concentration (nmol/pair silkgland)	己糖激酶活性 HK activity (nmol/pair silkgland)	磷酸果糖激酶 1 活性 PFK1 activity (nmol/pair silkgland · min)	1/2 丙酮酸激酶活性 1/2 PK activity (nmol/pair silkgland · min)	1/2 丙酮酸含量 1/2 PA concentration (nmol/pair silkgland)
合成早期 Early stage of synthesis	–	174.07 ± 8.29 d	53.63 ± 0.85 c	304.88 ± 7.43 e	5.57 ± 0.75 f
合成中期 Middle stage of synthesis	–	529.41 ± 17.73 a	172.25 ± 2.69 a	574.25 ± 23.60 a	31.84 ± 2.34 e
合成晚期 Late stage of synthesis	–	549.59 ± 33.09 a	180.36 ± 5.78 a	247.00 ± 16.90 d	52.21 ± 7.24 c
分泌早期 Early stage of secretion	–	371.72 ± 14.68 b	137.71 ± 8.04 b	267.08 ± 17.24 d	40.91 ± 1.38 d
分泌中期 Middle stage of secretion	–	278.48 ± 16.96 c	136.19 ± 11.27 b	495.61 ± 12.08 b	62.23 ± 3.65 b
分泌晚期 Late stage of secretion	–	271.84 ± 10.74 c	120.92 ± 8.38 b	424.13 ± 12.12 c	86.36 ± 4.01 a

–：未检测到 Not detected. 表中数据为平均值 ± 标准误，表中数据等于实际测定值除以理论比值。同一测定指标同列数据后不同小写字母表示差异显著(单因素方差分析，$P<0.05$)。下表同。Data are means ± *SE*. Data are the measured values divided by their theoretical ratios, and those for the same index in a column with different small letters are significantly different (one-way ANOVA, $P<0.05$). The same for the following tables.

2.2 丝蛋白合成和分泌期丝腺中丙酮酸脱氢相关指标的变化

表 2 显示了丝蛋白合成和分泌期丝腺中丙酮酸脱氢相关指标的变化。PDH 活性在丝蛋白合成期呈升高趋势,相反在丝蛋白分泌期呈下降趋势;AC 含量分别在丝蛋白合成中期和丝蛋白分泌中期出现峰值。比较表 1 和 2 可以发现,PFK1 活性和 PDH 活性变化趋势相同,但是 1/2 PFK1 活性 > 1/2 PDH 活性;PA 含量和 AC 含量变化趋势不同,而且 1/2 PA 含量 > 1/2 AC 含量。

表 2 丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中丙酮酸脱氢相关指标的变化

Table 2 Changes in the related indexes of pyruvate degeneration in the silkgland of *Bombyx mori* during the synthesis and secretion of silk proteins

取样时期 Sampling stage	1/2 丙酮酸脱氢酶活性 1/2 PDH activity (nmol/pair silkgland · min)	1/2 乙酰 CoA 含量 1/2 AC concentration (nmol/pair silkgland)
合成早期 Early stage of synthesis	1.14 ± 0.12 f	1.79 ± 0.12 f
合成中期 Middle stage of synthesis	4.96 ± 0.55 c	19.96 ± 1.00 b
合成晚期 Late stage of synthesis	7.48 ± 0.45 b	17.78 ± 0.81 b
分泌早期 Early stage of secretion	9.21 ± 0.46 a	13.84 ± 1.65 c
分泌中期 Middle stage of secretion	6.83 ± 0.64 b	31.76 ± 1.16 a
分泌晚期 Late stage of secretion	3.25 ± 0.25 d	6.67 ± 0.45 d

2.3 丝蛋白合成和分泌期丝腺中三羧酸循环相关指标的变化

表 3 显示了丝蛋白合成和分泌期丝腺中三羧酸循环相关指标的变化。CS 活性在丝蛋白合成中期出现峰值,在丝蛋白分泌中期显著下降;ICDHm 活性在丝蛋白合成期呈现升高趋势,相反在丝蛋白分泌期呈现下降趋势;α-KGDH 活性在丝蛋白合成中期出现峰值,在丝蛋白分泌晚期显著下降;NADH 含量在丝蛋白合成晚期显著升高,相反在丝蛋白分泌晚期显著下降;酶活性呈现 1/2 ICDHm < 1/2α-KGDH < 1/2 CS 趋势。比较表 2 和 3 发现,PDH 和 ICDHm 活性变化趋势相同,但是 1/2 PDH 活性 > 1/2 ICDHm 活性;AC 含量和 NADH 含量变化趋势不同,而且 1/2 AC 含量 > 1/10 NADH 含量。

2.4 丝蛋白合成和分泌期丝腺中氧化磷酸化相关指标的变化

表 4 显示了丝蛋白合成和分泌期丝腺中氧化磷酸化相关指标的变化。NCR 活性在丝蛋白合成期呈现升高趋势,相反在丝蛋白分泌期呈现下降趋势;SCR, CCR, CCO 和 AS 活性变化趋势一致,在丝蛋白合成中期和丝蛋白分泌中期分别出现峰值;NAD^+ 和 ATP 含量与 NCR 活性变化趋势一致,在丝蛋白合成期升高,但在丝蛋白分泌期下降;ADP 和 AMP 含量变化趋势一致,在丝蛋白合成中期出现峰值,但是在丝蛋白分泌中期出现最低值;1/26 AS 活性显著小于 1/10 NCR, 1/2 SCR, 1/12 CCR 和 1/12 CCO 活性。比较表 3 和 4 发现,丝蛋白合成和分泌

表 3　丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中三羧酸循环相关指标的变化

Table 3　Changes in the related indexes of tricarboxylic acid cycle in the silkgland of *Bombyx mori* during the synthesis and secretion of silk proteins

取样时期 Sampling stage	1/2 柠檬酸合酶活性 1/2 CS activity (nmol/pair silkgland · min)	1/2 异柠檬酸脱氢酶活性 1/2 ICDHm activity (nmol/pair silkgland · min)	1/2 α-酮戊二酸脱氢酶活性 1/2 α-KGDH activity (nmol/pair silkgland · min)	1/10 还原型吡啶核酸含量 1/10 NADH content (nmol/pair silkgland)
合成早期 Early stage of synthesis	39.50 ± 1.23 e	0.58 ± 0.15 e	0.88 ± 0.12 d	0.25 ± 0.01 c
合成中期 Middle stage of synthesis	146.29 ± 6.80 a	3.72 ± 0.40 b	7.50 ± 0.57 a	0.24 ± 0.03 c
合成晚期 Late stage of synthesis	128.42 ± 4.35 b	5.88 ± 0.98 a	5.96 ± 0.80 b	1.50 ± 0.01 a
分泌早期 Early stage of secretion	102.88 ± 4.61 c	3.00 ± 0.36 bc	6.55 ± 0.81 ab	0.47 ± 0.01 b
分泌中期 Middle stage of secretion	59.55 ± 3.46 d	2.34 ± 0.41 c	6.88 ± 0.99 ab	0.51 ± 0.04 b
分泌晚期 Late stage of secretion	64.86 ± 1.26 d	1.43 ± 0.31 d	3.77 ± 0.76 c	0.24 ± 0.02 c

表 4　丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中氧化磷酸化相关指标的变化

Table 4　Changes in the related indexes of oxidative phosphorylation in the silkgland of *Bombyx mori* during the synthesis and secretion of silk proteins

取样时期 Sampling stage	1/10 NADH-泛醌还原酶活性 1/10 NCR activity (nmol/pair silkgland · min)	1/10 氧化型吡啶核苷酸含量 1/10 NAD^+ concentration (nmol/pair silkgland)	1/2 琥珀酸-泛醌还原酶活性 1/2 SCR activity (nmol/pair silkgland · min)	1/12 泛醌-细胞色素 C 还原酶活性 1/12 CCR activity (nmol/pair silkgland · min)	1/12 细胞色素 C 氧化酶活性 1/12 CCO activity (nmol/pair silkgland · min)
合成早期 Early stage of synthesis	0.24 ± 0.03 e	0.03 ± 0.01 d	2.50 ± 0.15 d	2.47 ± 0.07 c	1.07 ± 0.07 e
合成中期 Middle stage of synthesis	4.03 ± 0.34 c	0.61 ± 0.06 b	34.79 ± 0.52 a	12.51 ± 0.19 a	1.63 ± 0.34 d
合成晚期 Late stage of synthesis	6.60 ± 0.36 b	0.92 ± 0.06 a	6.53 ± 0.73 c	3.16 ± 0.18 b	0.57 ± 0.09 f
分泌早期 Early stage of secretion	9.99 ± 0.48 a	0.96 ± 0.11 a	18.37 ± 0.75 b	1.07 ± 0.18 d	2.08 ± 0.16 c
分泌中期 Middle stage of secretion	4.86 ± 0.22 c	0.66 ± 0.06 b	8.09 ± 0.52 c	1.04 ± 0.15 d	3.73 ± 0.17 a
分泌晚期 Late stage of secretion	1.41 ± 0.10 d	0.51 ± 0.04 c	2.88 ± 0.46 d	0.86 ± 0.10 d	3.18 ± 0.09 b

取样时期 Sampling stage	1/30 腺苷二磷酸含量 1/30 ADP concentration (nmol/pair silkgland)	1/30 腺苷单磷酸含量 1/30 AMP concentration (nmol/pair silkgland)	1/26 腺苷三磷酸合酶活性 1/26 AS activity (nmol/pair silkgland · min)	1/30 腺苷三磷酸含量 1/30 ATP concentration (nmol/pair silkgland)
合成早期 Early stage of synthesis	0.08 ± 0.00 e	0.16 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 f	0.08 ± 0.00 e
合成中期 Middle stage of synthesis	0.39 ± 0.01 a	0.80 ± 0.00 a	0.30 ± 0.01 a	0.28 ± 0.00 b
合成晚期 Late stage of synthesis	0.26 ± 0.01 c	0.61 ± 0.00 b	0.06 ± 0.01 e	0.38 ± 0.01 a
分泌早期 Early stage of secretion	0.24 ± 0.00 d	0.48 ± 0.00c	0.15 ± 0.01 c	0.35 ± 0.02 a
分泌中期 Middle stage of secretion	0.26 ± 0.00 b	0.28 ± 0.00 e	0.23 ± 0.01 b	0.23 ± 0.00 c
分泌晚期 Late stage of secretion	0.40 ± 0.01 a	0.39 ± 0.01 d	0.10 ± 0.01 d	0.19 ± 0.01 d

期丝腺中 1/2 ICDHm 活性 > 1/26 AS 活性；除了丝蛋白合成中期外，其余时期丝腺中 1/10 NADH 含量 > 1/30 ATP 含量。

2.5 丝蛋白合成和分泌期丝腺中能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值的变化

表 5 显示了丝蛋白合成和分泌期丝腺中能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值的变化。丝蛋白合成中期丝腺中能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值显著低于早期和晚期，相反丝蛋白分泌中期能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值显著高于早期和晚期。除了晚期外，丝蛋白合成期能荷显著低于丝蛋白分泌期；除了中期外，丝蛋白合成期 $NADH/NAD^+$ 比值显著高于丝蛋白分泌期。

表 5 丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值的变化

Table 5 Changes in energy charge and the ratio of NADH to NAD^+ in the silkgland of *Bombyx mori* during the synthesis and secretion of silk proteins

取样时期 Sampling stage	能荷 Energy charge	$NADH/NAD^+$ 比值 Ratio of NADH to NAD^+
合成早期 Early stage of synthesis	0.36 ± 0.00 d	2.80 ± 0.23 a
合成中期 Middle stage of synthesis	0.32 ± 0.00 e	0.40 ± 0.08 e
合成晚期 Late stage of synthesis	0.41 ± 0.00 c	1.64 ± 0.10 b
分泌早期 Early stage of secretion	0.44 ± 0.01 b	0.49 ± 0.05 d
分泌中期 Middle stage of secretion	0.47 ± 0.00 a	0.77 ± 0.09 c
分泌晚期 Late stage of secretion	0.40 ± 0.00 c	0.46 ± 0.05 de

3 讨论

3.1 家蚕丝腺有氧氧化的特性

本实验测定结果表明，家蚕丝腺中糖酵解途径 3 个调控关键酶 PFK1，HK 和 1/2 PK 中以 PFK1 活性最低；三羧酸循环 3 个调控关键酶活性的排列次序为：1/2 ICDHm 活性 < 1/2 α-KGDH 活性 < 1/2 CS 活性；氧化磷酸化相关酶 1/26 AS，1/12 CCR，1/12 CCO，1/2 SCR 和 1/10 NCR 中，以 1/26 AS 活性最低。可见，PFK，ICDHm 和 AS 分别是家蚕丝腺中糖酵解途径、三羧酸循环和氧化磷酸化的限速酶。由于 PDH 是丙酮酸脱氢阶段的唯一催化酶，所以该阶段的限速酶是 PDH。进一步比较家蚕丝腺中 PFK，PDH，ICDHm 和 AS 活性可以发现，PFK1 活性 > 1/2 PDH 活性 > 1/2 ICDHm 活性 > 1/26 AS 活性。限速酶活性反映代谢的最大可能速率。因此，家蚕丝腺中 AS 是有氧氧化的限速酶，而且糖酵解途径、丙酮酸脱氢、三羧酸循环和氧化磷酸化的最大可能速率依次递减。AC，NADH 和 ATP 分别是糖酵解途径、PA 脱氢、三羧酸循环和氧化磷酸化的主要产物。本实验测定结果表明，上述产物含量呈现 1/2 PA > 1/2 AC > 1/10 NADH > 1/30 ATP 的趋势。产物含量反映代谢的实际速率。因此，家蚕丝腺中糖酵解途径、丙酮酸脱氢、三羧酸循环和氧化磷酸化的实际速率依次递减。可见，家蚕丝腺中有氧氧化的糖酵解途径、丙酮酸脱氢、三羧酸循环和氧化磷酸化 4 个阶段的最大可能速率和实际速率具有依次递减的特性。

有氧氧化的糖酵解途径、丙酮酸脱氢和三羧酸循环 3 个阶段不仅产生 NADH 和 $FADH_2$，供氧化磷酸化阶段合成 ATP，而且其中间产物还用于氨基酸等其他物质的合成。家蚕丝腺合成丝蛋白需要充足的氨基酸和 ATP。家蚕丝腺中有氧氧化的糖酵解途径、丙酮酸脱氢、三羧酸循环和氧化磷酸化 4 个阶段的速率具有依次递减的特性表明：有氧氧化速率对 ATP 需要量的变化最敏感，同时糖酵解途径、丙酮酸脱氢和三羧酸循环速率大于氧化磷酸化速率能够保证氧化磷酸化所需要的 NADH 和 $FADH_2$ 供应，以及丝蛋白合成所需的氨基酸的供应。

3.2 丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中有氧氧化的差异

本实验结果表明，丝蛋白合成期丝腺中糖酵解途径限速酶 PFK1 活性、丙酮酸脱氢催化酶 PDH 活性、三羧酸循环限速酶 ICDHm 活性、氧化磷酸化第一个催化酶 NCR 活性、氧化磷酸化主要底物 NADH 含量和有氧氧化最主要的产物 ATP 含量总体上呈现升高趋势，相反在丝蛋白分泌期上述指标总体上呈现下降趋势。可见，总体上家蚕丝腺的有氧氧化在丝蛋白合成期加强，在丝蛋白分泌期下降。

3.3 丝蛋白合成和分泌期家蚕丝腺中有氧氧化的调控

能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值在有氧氧化调控中具有重要作用，两者升高表明 ATP 供应水平充足，并且反馈抑制有氧氧化的进行；相反两者下降表明 ATP 供应水平不足，并且反馈促进有氧氧化的进行（Fernie *et al.*，2004；查锡良，2008）。本实验结果表明，丝蛋白合成中期丝腺中能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值显著低于早期和晚期，相反丝蛋白分泌中期能荷和 $NADH/NAD^+$ 比值显著高于早期和晚期。可

见，随着丝蛋白的合成，丝蛋白合成中期家蚕丝腺 ATP 供应水平不足，反馈促进有氧氧化的进行，增加 ATP 供给；相反随着丝蛋白的分泌，丝蛋白分泌中期家蚕丝腺 ATP 供应充足，反馈抑制有氧氧化的进行，减少 ATP 供给。

哺乳动物能量代谢研究表明，AMPK（AMP-activated protein kinase）和 AKT［又称蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB）］在有氧氧化调控中具有重要作用（Hahn-Windgassen *et al.*，2005；Gwinn *et al.*，2008）。今后应该调查家蚕丝腺的能量代谢中是否存在类似机制。

3.4　家蚕中部和后部丝腺中可能存在 GOD 抑制物质

家蚕丝腺进一步分为前部、中部和后部丝腺（Li *et al.*，2011）。GOD 基因在前部和中部丝腺都有表达，但是在后部丝腺不表达；GOD 蛋白数量与其基因转录水平变化趋势不一致；GOD 活性以前部丝腺最高，中部丝腺很低，后部丝腺无活性；GOD 通过合成 H_2O_2 阻止家蚕前部丝腺细胞的程序性死亡（Matsui *et al.*，2011）。GOD 法是利用 GOD 催化葡萄糖脱氢产生 H_2O_2 来检测 Glc 含量的常规方法。但是，本实验利用 GOD 法检测家蚕整个丝腺中 Glc 含量时，未能检测到 Glc。因此，家蚕中部和后部丝腺中可能存在 GOD 活性的抑制剂，从而导致测定失败。今后有必要提取、分离和纯化家蚕中部和后部丝腺中抑制 GOD 活性的物质，并且进一步探讨其在家蚕丝腺中的可能生理功能。

参考文献（References）

Fernie AR，Carrari F，Sweetlove LJ，2004. Respiratory metabolism：glycolysis，the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*，7：254 – 261.

Gwinn DM，Shackelford DB，Egan DF，Mihaylova MM，Mery A，Vasquez DS，Shaw RJ，2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*，30（2）：214 – 226.

Hahn-Windgassen A，Nogueira V，Chen CC，Skeen JE，Sonenberg N，Hay N，2005. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *Journal of Biological Chemistry*，280（37）：32081 – 32089.

Li JY，Yang HJ，Lan TY，Wei H，Zhang HR，Chen M，Fan W，Ma YY，Zhong BX，2011. Expression profiling and regulation of genes related to silkworm posterior silk gland development and fibroin synthesis. *Journal of Proteome*，10：3551 – 3564.

Matsui H，Kakei M，Iwami M，Sakurai S，2011. Glucose oxidase prevents programmed cell death of the silkworm anterior silk gland through hydrogen peroxide production. *FEBS Journal*，278：776 – 786.

Xiang ZH，2005. Biology of Sericulture. China Forestry Publishing House，Beijing. 72，288 – 291.［向仲怀，2008. 蚕丝生物学. 北京：中国林业出版社. 72，288 – 291］

Zha XL，2008. Biochemistry. People's Medical Publishing House，Beijing. 88 – 102，291 – 320.［查锡良，2008. 生物化学. 北京：人民卫生出版社. 88 – 102，291 – 320］

（责任编辑：赵利辉）